

УДК 617.7-007.681-085

Оценка возможностей снижения токсического действия антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего консервант бензалкония хлорид, на первичную культуру клеток лимба роговицы с помощью слезозаменителя Стиллавит® (экспериментальное исследование)

Егорова Г.Б., д.м.н., главный научный сотрудник отдела рефракционных нарушений;
Еричев В.П., д.м.н., профессор, заместитель директора по инновационной деятельности;
Суббот А.М., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии;
Федоров А.А., к.м.н., заведующий лабораторией фундаментальных исследований в офтальмологии;
Нестерова Т.В., лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии;
Габашвили А.Н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии;
Аверич В.В., младший научный сотрудник отдела рефракционных нарушений.

ФГБНУ «НИИ глазных болезней», Москва, 119021, ул. Россолимо, 11А, Б.

Авторы не получали финансирование при проведении исследования и написании статьи. Конфликт интересов: отсутствует.

Резюме

ЦЕЛЬ. Оценка цитотоксичности антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего в составе бензалкония хлорид, и протекторного действия слезозаменителя Стиллавит® на культуре клеток лимба роговицы.

МЕТОДЫ. Тестируемые образцы: латанопрост 0,005%, в качестве консерванта используется бензалкония хлорид 0,02% (БХ); Стиллавит® (натрия гиалуронат 0,16%, хондроитина сульфат натрия 0,05%, D-пантенол 1%, консервант — тетраборат натрия 0,05%). Была использована первичная культура клеток лимба роговицы. На первом этапе исследования оценивали эффект воздействия на клеточную культуру препаратов в 100% концентрации: латанопрост+БХ; и с одновременным добавлением в культуру Стиллавита. На втором этапе был проведен анализ влияния последовательных разведений препаратов на показатели цитотоксичности. Задачей третьего этапа была оценка уровня жизнеспособности клеток после экспозиции их с разведенными веществами в различной комбинации: латанопрост+БХ (воздействие в течение 30 минут); последовательное добавление в культуру Стиллавита и затем через 30 минут добавление препарата (латанопрост+БХ); одновременное добавление в культуру Стиллавита и препарата (латанопрост+БХ).

Для оценки жизнеспособности клеток в культуре был проведен МТС-тест с использованием набора CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent («Promega»). Дополнительно проводилось цитологическое исследование полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Уровень жизнеспособности клеток при внесении препарата (латанопрост+БХ) в 100% концентрации составляет $13,95 \pm 4,014\%$. При внесении исследуемого антиглаукомного препарата совместно со Стиллавитом уровень жизнеспособности достигает $22,03 \pm 3,152\%$. В результате второй серии экспериментов было установлено, что выживаемость клеток на уровне 60-80% наблюдается при разведении препарата (латанопрост+БХ) в образце в 32 раза, а в отношении препарата к объему составляет 6,25%. На третьем этапе оценивали уровень жизнеспособности клеток при внесении к ним препаратов в разведении 6,25%. Уровень выживаемости клеток при воздействии препарата латанопрост+БХ составил $68,49 \pm 20,61\%$. Было установлено, что как предварительное за 30 минут до внесения препарата (латанопрост+БХ), так и одновременное добавление Стиллавита увеличивает показатели выживаемости клеточной культуры — $94,95 \pm 12,52$ и $103,8 \pm 12,45\%$ соответственно. Наблюдаемые различия статистически значимы при уровне надежности 95%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. По результатам проведенных исследований *in vitro* были доказаны цитопротекторные свойства слезозаменителя Стиллавит в комбинации с препаратом, содержащим латанопрост+БХ, как при их 100%, так и 6,25% концентрации, что было подтверждено с помощью цитологического исследования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитотоксичность, бензалкония хлорид, культура клеток лимба роговицы, глаукома, антиглаукомная терапия, Стиллавит.

Для контактов:

Аверич Вероника Валерьевна, e-mail: veronikky@mail.ru

Поступила в печать: 10.09.2017

Received for publication: September 10, 2017

ENGLISH

Evaluation of Stillavit® artificial tears potential in reducing the toxic effect of benzalkonium chloride-containing hypotensive instillations on primary cell culture of the corneal limbus (experimental study)

EGOROVA G.B., Med.Sc.D., Senior research associate of the Refractive Disorders department;

ERICHEV V.P., Med.Sc.D., Professor, Deputy Director for Innovative Studies;

SUBBOT A.M., Ph.D., Senior research associate of the Laboratory of fundamental research in ophthalmology;

FEDOROV A.A., Ph.D., Head of the Laboratory of fundamental research in ophthalmology;

NESTEROVA T.V., Laboratory researcher of the Laboratory of fundamental research in ophthalmology;

GABASHVILI A.N., Research associate of the Laboratory of fundamental research in ophthalmology;

AVERICH V.V., Junior research associate of the Department of refractive disorders.

Scientific Research Institute of Eye Diseases, 11A Rossolimo st., Moscow, Russian Federation, 119021.

Conflict of interest and source of finding: none declared.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the cytotoxicity of hypotensive instillation containing benzalkonium chloride and the protective effect of Stillavit® artificial tears on the corneal limbus primary cell culture.

METHODS: Test samples: 1) latanoprost 0.005%, containing benzalkonium chloride (BC) 0.02% as a preservative agent 2) Stillavit®, containing sodium hyaluronate 0,16%, chondroitin sulfate sodium of 0.05%, D-panthenol 1% and sodium tetraborate 0,05% acting as preservative. Primary cell culture of the corneal limbus was used for the assessment. At the first stage of the research we estimated the effect of a 100% concentration of latanoprost+BC and Stillavit on the cell culture. At the second stage we analyzed the influence of agents' serial dilution on cytotoxicity indicators. The aim of the third stage was the assessment of cell viability level after their exposure to diluted substances in three various combinations: single latanoprost + BC (30 min exposure); simultaneous and consecutive adding of Stillavit and latanoprost + BC to the culture with a 30 min interval. To evaluate the cell culture viability we carried out MTS test using CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent («Promega»). Obtained results underwent additional cytological examination.

RESULTS: Cell viability level after the exposure to a 100% concentration of latanoprost+BC amounted to $13.95 \pm 4.014\%$. In cases of exposing the culture to a combination of latanoprost + BC and Stillavit, viability level reached $22.03 \pm 3.152\%$. The second stage of the research revealed that the cell culture has a survival rate of 60-80% if the drug (latanoprost + BC) in the sample is diluted 32-fold, and in relation to drug volume amounts to 6.25%. Consequently, in the third stage of the research we evaluated cell viability level exposing them to a 6.25% dilution of the drug. Cell survival rate after single latanoprost + BC exposure equaled $68.49 \pm 20.61\%$. Both simultaneous and consecutive adding of Stillavit (30 min prior to the drug) increased cell survival rate: 94.95 ± 12.52 and $103.8 \pm 12.45\%$ respectively. The observed difference was statistically significant in both cases (95% reliability level).

CONCLUSION: In vitro studies results have shown the protective effect of Stillavit artificial tears on the cell culture in combination with both 100% and 6.25% latanoprost + BC, confirmed by a cytological examination.

KEYWORDS: cytotoxicity, benzalkonium chloride, cell culture corneal limbus, glaucoma, glaucoma therapy, Stillavit.

Глаукома — хроническое заболевание, лечение которого начинается с медикаментозной терапии. Длительность лечения может быть неопределенно продолжительной: от нескольких месяцев до нескольких лет. В настоящее время практически все антиглаукомные препараты содержат в своем составе консерванты. Наиболее часто используемым из них является бензалкония хлорид (БХ). Он способен растворять мембраны бактерий, благодаря чему в низких концентрациях (от 0,004 до 0,025%) широко используется в составе различных глазных капель [1].

Бензалкония хлорид, обладающий детергентными свойствами, вступает в реакцию с липидами слезной пленки, разрушает липидный слой, вызывает внутриклеточные изменения эпителиальных клеток, нарушая их барьерную функцию, тем самым создавая условия для проникновения в переднюю камеру и задние отделы глаза [4-8]. Длительное воздействие инстилляций медикаментозных препаратов с БХ может вызвать появление признаков вторичного синдрома «сухого глаза» [1, 2].

Недостаток слезы, нарушение стабильности слезной пленки являются дополнительными факторами

усиления действия консерванта на глазную поверхность, что определяет целесообразность одновременного использования слезозаменителей при антиглаукомной гипотензивной терапии.

Объектом исследования нами была выбрана первичная культура клеток роговичного лимба. Эта зона считается основным источником клеток для репарации глазной поверхности. Токсическое повреждение клеток, входящих в локальный прогениторный пул и формирующих его тканевую нишу, может быть патогенетической основой для развития патологического состояния тканей глазной поверхности. Преимуществом исследования на клеточной культуре является возможность стандартизировать условия проведения эксперимента, что позволяет сравнивать эффект от применения сразу нескольких веществ.

Для обоснования использования слезозаменителей в комплексе с гипотензивными препаратами при глаукоме с целью снижения их токсического действия на клетки и доказательства их протекторного действия было предпринято данное исследование.

Цель настоящей работы — оценка цитотоксичности антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего в составе БХ, и протекторного действия слезозаменителя Стиллавит® на культуре клеток лимба роговицы.

Материалы и методы

Тестируемые образцы:

- *антиглаукомный гипотензивный препарат*, действующее вещество — латанопрост 0,005%, в качестве консерванта содержит БХ 0,02% (в тексте обозначен как «латанопрост+БХ»);

- *Стиллавит®*, действующие вещества: гиалуронат натрия 0,16%, хондроитина сульфат натрия 0,05%, D-пантенол 1%, консервант — тетраборат натрия 0,05%.

Была использована первичная культура клеток лимба роговицы. Клетки были получены методом проращивания из эксплантата, культивировались на ростовой среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 Ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, «Gibco»), GlutaMax (2 mM, «Gibco») и 15% фетальной сыворотки телят («Biowest»). Исследование проводили на клетках 3-го пассажа (пассаж — 1 неделя) в стандартных условиях при температуре +37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки высаживались в лунки 96-луночного культурального планшета (по 3 тыс. клеток на лунку в 100 мкл ростовой среды). После 24 часов культивирования вносили исследуемый препарат.

Экспозицию с препаратом проводили на протяжении короткого времени — 30 минут, повторяя динамику максимального контакта в слезной жидкости. После времени экспозиции среду заменяли и проводили оценку эффекта.

На первом этапе исследования был оценен эффект воздействия на клеточную культуру препаратов в 100% концентрации:

- латанопрост+БХ;
- одновременное добавление в культуру Стиллавита и препарата (латанопрост+БХ).

На втором этапе проведен анализ влияния последовательных разведений препаратов на показатели цитотоксичности, по результатам которого выбрана концентрация, при которой показатели выживаемости клеток были на уровне 60-80%. Выбранное разведение принято как «оптимальное» и следующую серию исследований проводили при данной концентрации препарата.

В результате было установлено, что 80% выживаемость клеток наблюдается при разведении препарата (латанопрост+БХ) в образце в 32 раза, что в пересчете на содержание БХ составляет 0,0125 мг/мл, а в отношении к объему лунки составляет 6,25%. Данное разведение было принято как оптимальное и следующая серия исследований проводилась при данной концентрации препарата.

Задачей третьего этапа была оценка уровня жизнеспособности клеток после экспозиции их с разведенными веществами в различной комбинации:

- латанопрост+БХ (воздействие в течение 30 минут);
- последовательное добавление в культуру Стиллавита и затем через 30 минут добавление препарата (латанопрост+БХ);
- одновременное добавление в культуру Стиллавита и препарата (латанопрост+БХ).

Для оценки жизнеспособности клеток в культуре был использован МТС-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолиум) с применением набора CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent («Promega»). МТС-тест является колориметрическим методом, позволяющим определить число жизнеспособных клеток по их митохондриальной активности.

В каждую лунку добавляли 20 мкл МТС-реагента. Положительным контролем служили лунки с клетками без исследуемых препаратов; в качестве бланка использовали лунки с ростовой средой. Планшет инкубировали в течение 4 часов при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе при λ = 490 нм через 4 часа после внесения реагента.

Количество жизнеспособных клеток рассчитывалась по формуле:

$$(A_o - A_b) / (A_k - A_b) * 100\%, \text{ где}$$

A_o — среднее значение оптической плотности в образце, A_b — в бланке, A_k — в контроле.

Цитологическое исследование выполняли методом окраски фрагмента клеточной культуры на стекле по Гимза [3].

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism. Нормальность распределения данных проверяли тестами

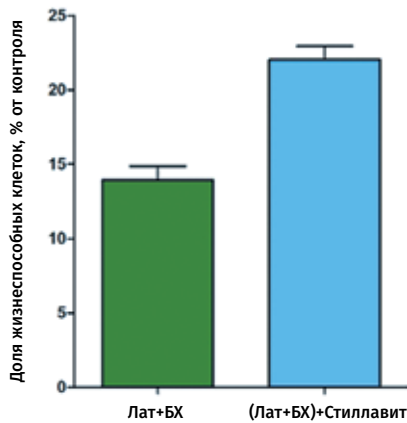


Рис. 1. Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы после экспозиции с латанопростом+БХ (Лат+БХ) и Стиллавитом в 100% концентрации

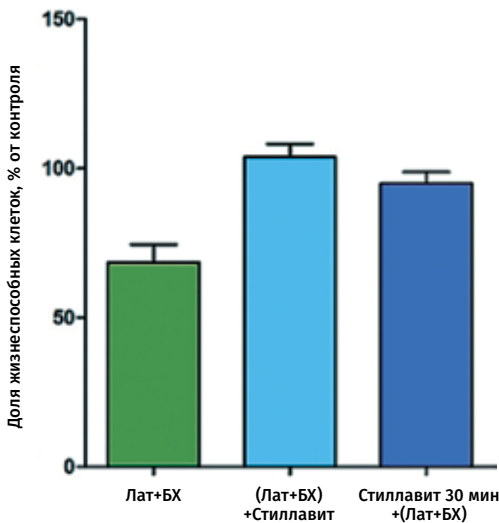


Рис. 2. Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы после экспозиции в разных схемах со Стиллавитом и латанопростом+БХ (Лат+БХ) при разведении 6,25%

Колмогорова – Смирнова, Д’Агостино и Шапиро – Уилка. Различия между группами оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Уровень жизнеспособности клеток при внесении препарата (латанопрост+БХ) в 100% концентрации составляет $13,95 \pm 4,014\%$ от контрольных значений (среднее значение \pm стандартное отклонение). Низкий уровень выживаемости клеток объясним, т. к. клеточная культура *in vitro* изолирована и невозможно воспроизвести весь комплекс защитно-приспособительных механизмов клеточных элементов тканей.

Снижение устойчивости клеток к неблагоприятным внешним воздействиям обусловлено многими факторами: клетки находятся в состоянии

изоляции от других клеток, т. к. отсутствуют клеточные контакты, нет сформированного эпителиального пласта, трофической поддержки, а также системы удаления метаболитов. В значительной мере снижение устойчивости клеток может быть обусловлено отсутствием защитного действия слезной пленки. Слой гликокаликса, который во взаимодействии с муцинами слезной пленки создает определенный защитный барьер, также сформирован не полностью.

При внесении исследуемого антиглаукомного препарата совместно со Стиллавитом уровень жизнеспособности достоверно возрастает (на 8,08%) и достигает $22,03 \pm 3,152\%$, что свидетельствует о снижении токсического действия на культуру клеток лимба роговицы (рис. 1).

В результате второй серии экспериментов было установлено, что выживаемость клеток на уровне 60-80% наблюдали при разведении препарата (латанопрост+БХ) в образце в 32 раза, что в пересчете на содержание бензалкония хлорида составляет 0,0125 мг/мл, а в отношении препарата к объему составляет 6,25%.

Выживаемость клеток при внесении только Стиллавита при разведении его в 32 раза (6,25% от объема) составила $91,17 \pm 8,126\%$. Данный результат свидетельствует о снижении, хотя и незначительном, количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем под воздействием Стиллавита, что может быть связано с наличием в его составе консерванта тетрабората натрия. Хотя данный консервант гораздо более «мягкий» по сравнению с БХ, нельзя исключить и его цитотоксического воздействия на культуру клеток лимба роговицы.

На следующем этапе оценивали уровень жизнеспособности клеток при внесении к ним препаратов в разведении 6,25%. Уровень выживаемости клеток при воздействии препарата (латанопрост+БХ) в концентрации 6,25% составил $68,49 \pm 20,61\%$. Цитотоксическое действие препарата вызвало снижение количества жизнеспособных клеток на 31,5% по сравнению с контролем.

Было установлено, что как предварительное (за 30 минут до внесения препарата (латанопрост+БХ)), так и одновременное добавление Стиллавита увеличивает показатели выживаемости клеточной культуры — $94,95 \pm 12,52$ и $103,8 \pm 12,45\%$ соответственно (рис. 2). Наблюдаемые различия статистически значимы при уровне надежности 95%.

На цитологическом препарате лимбальные клетки визуализируются в виде слоя мономорфных вытянутых овальных клеток с проминирующими ядрышками (рис. 3А). Нередко встречается картина митоза (рис. 3Б).

Через 30 мин после внесения в культуру клеток препарата латанопрост + БХ и одновременно Стиллавита в целом структура клеточного пласта

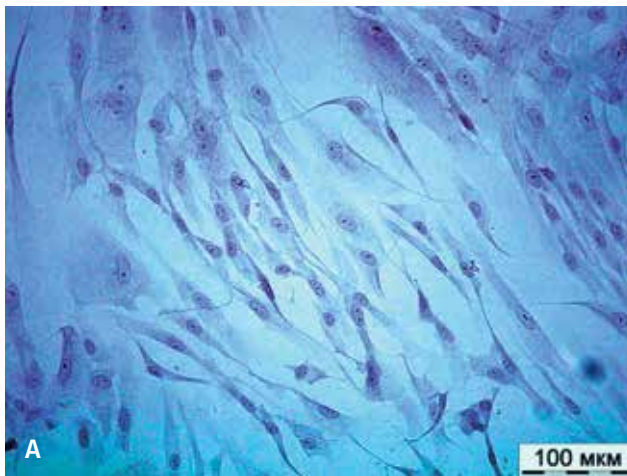


Рис. 3. Исходное состояние культуры лимбальных клеток. Окраска по Гимза (объяснение в тексте)

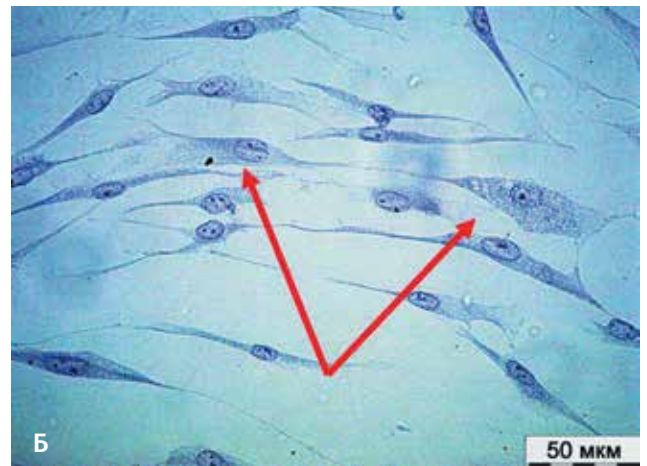
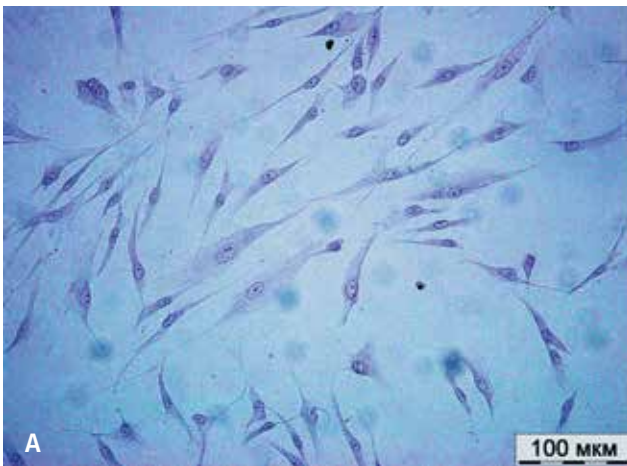


Рис. 4. Состояние клеток лимба через 30 мин воздействия препарата (латанопрост+БХ) и одновременно Стиллавита. Окраска по Гимза (объяснение в тексте)

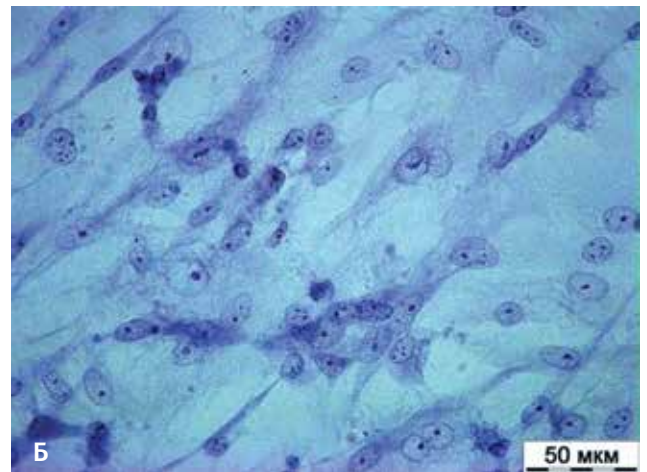
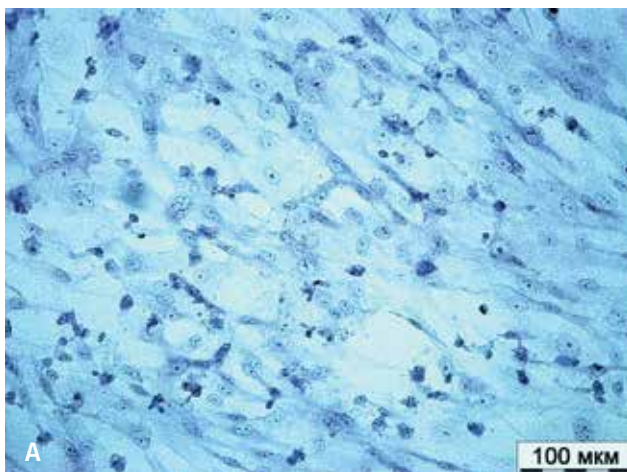


Рис. 5. Состояние клеток лимба через 30 мин воздействия препарата (латанопрост+БХ). Окраска по Гимза (объяснение в тексте)

сохранялась неизменной (рис. 4А). Размеры отдельных клеток были увеличены за счет микровacuолизации цитоплазмы, хроматолиза и отека ядра (показано стрелкой) (рис. 4Б).

Воздействие препарата (латанопрост+БХ) в течение 30 минут без протекции привело к значительным изменениям в виде уменьшения плотности клеток в результате кариолиза и последующего

цитоллиза значительной части клеток (рис. 5А). Остальные клетки отличали полиморфизм, кариопикноз, менее упорядоченное расположение, свидетельствующие о начале некротических изменений (рис. 5Б).

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о токсическом повреждающем действии на культуру клеток лимба препарата, содержащего в своем составе латанопрост+БХ 0,02%.

Положительный защитный эффект слезозаместителя Стиллавит® в комбинации с препаратом, содержащим латанопрост+БХ, был показан как при их 100%, так и 6,25% концентрации, что было подтверждено с помощью цитологического исследования.

Слезозаместительный препарат Стиллавит® способен оказывать цитопротекторный эффект на культуру клеток лимба, подвергшихся воздействию антиглаукомного препарата, содержащего в своем составе латанопрост+БХ.

Полученные результаты дают возможность обосновать целесообразность применения слезозаместительной терапии Стиллавитом у пациентов с глаукомой, длительно использующих гипотензивные консервантсодержащие препараты, для лечения и профилактики признаков эпителиопатии.

Литература/References

1. Еричев В.П., Амбарцумян К.Г. Консерванты и вторичный синдром «сухого глаза» при длительной местной медикаментозной терапии первичной открытоугольной глаукомы. *Глаукома* 2011; 2:59-66. [Erichiev V.P., Ambartsumyan K.H. The preservatives and secondary dry eye syndrome in long-term topical open-angle glaucoma therapy. *Glaucoma* 2011; 2:59-66. (In Russ.)].
2. Еременко А.И., Янченко С.В. Классификация факторов риска при вторичном сухом глазе. *Фундаментальные исследования* 2006; 7:34. [Eremenko A.I., Yanchenko S.V. Classification of risk factors in secondary dry eye. *Fundamental research* 2006; 7:34. (In Russ.)].
3. Федоров А.А. Морфологические основы научных исследований в офтальмологии. *Вестник офтальмологии* 2013; 129(5):10-21 [Fedorov A.A. Morphological bases of scientific researches in ophthalmology. *Vestn oftalmol* 2013; 129(5):10-21. (In Russ.)].
4. Ammar D.A., Noecker R.J., Kahook M.Y. Effects of benzalkonium chloride-and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells. *Advances in therapy* 2011; 28(6):501-510. <https://doi.org/10.1007/s12325-011-0029-x>
5. Khoh-Reiter S., Jessen B.A. Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model. *BMC ophthalmology* 2009; 9(1):5. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-9-5>
6. Rolando M. et al. The effect of different benzalkonium chloride concentrations on human normal ocular surface: a controlled prospective impression cytology study. *The Lacrima System*. Amsterdam: Kagler&Ghedini; 1991:89-91.
7. Rasmussen C.A., Kaufman P.L., Kiland J.A. Benzalkonium chloride and glaucoma. *J Ocular Pharmacol Ther* 2014; 30(2-3):163-169. <https://doi.org/10.1089/jop.2013.0174>
8. Yanochko G.M. et al. Comparison of preservative-induced toxicity on monolayer and stratified Chang conjunctival cells. *Toxicology in Vitro* 2010; 24(4):1324-1331. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.02.001>

Поступила 10.09.2017